

HLA-DR 拘束性に慢性関節リウマチ滑膜細胞特異的 抗原を認識する CD4+CD8-T 細胞クローンの樹立と 解析

著者	前田 朋子
号	3024
発行年	1998
URL	http://hdl.handle.net/10097/21680

氏 名（本籍） まえ 前 だ 田 とも 朋 こ 子

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 第 3 0 2 4 号

学位授与年月日 平 成 10 年 3 月 4 日

学位授与の条件 学位規則第 4 条第 2 項該当

最 終 学 歴 平 成 5 年 3 月 26 日
東京大学農学部獣医学科卒業

学 位 論 文 題 目 Recognition of synovial cell antigen by CD4
+CD8-T cell clones established from rheu-
matoid arthritis patients.

（HLA-DR 拘束性に慢性関節リウマチ滑膜細胞特
異的抗原を認識する CD4+CD8-T 細胞クロン
の樹立と解析）

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教授 伊 藤 恒 敏 教授 佐 竹 正 延

教授 佐々木 毅

論文内容要旨

【目 的】

慢性関節リウマチ (RA) は自己免疫疾患とされているが、その原因抗原は不明で、病態解析のための有用な動物モデルも得られていない。RA 特異抗原の探索を目的とした従来の報告では、T 細胞クローンは樹立時に特定の抗原 (Ⅱ型コラーゲン, heat shock protein 等) での刺激により得られたものであった。炎症の起きている部位では、種々の特異性を持つ T 細胞が呼び寄せられていることを考えれば、今までの方法では厳密な RA 特異性を検討することは困難と思われた。そこで本研究では、RA 患者より特定の抗原に非依存性に自己反応性 T 細胞クローンを樹立し、RA における病態発現の機序とより疾患特異的な RA 治療の可能性を探るために、RA 特異的抗原の存在を検討した。

【材 料 と 方 法】

2 名の日本人女性 RA 患者 (HLA-DR4/9, HLA-DR9/15) より、滑膜および関節液のあわせて 4 サンプルを得て、IL-2 存在下にて浸潤 T 細胞のクローニングを行い、そのうち CD4 陽性の T 細胞に関して解析を行った。以下に示すクローンの反応性とは、 ^3H -thymidine の取込みを指標とした増殖活性を意味する。

【結 果】

樹立された 146 の CD4 陽性 T 細胞クローンのうち、自己の滑膜細胞と反応性を示し、自己と同一の HLA-DR を発現していない RA 滑膜細胞に対しては反応性を示さない 8 クローンを「自己反応性 T 細胞クローン」とした。自己反応性 T 細胞クローンはすべて CD8 陰性、CD45RO および HLA-DR 陽性であった。これらのクローンの自己反応性は、抗 HLA-DR 抗体あるいは抗 TCR $\alpha\beta$ 抗体により完全に抑制された。また、これらのクローンは HLA-DR4 あるいは DR9 を発現する非自己由来 RA 滑膜細胞に対しても HLA-DR 拘束性に反応した。しかし、自己あるいは HLA-DR-matched の末梢血抗原提示細胞 (APC) には反応せず、クローンの認識する抗原は滑膜細胞の HLA-DR 上に特異的に提示されている可能性が示唆された。

これらのクローンの使用する TCR α および β 鎖についてその塩基配列より予想されるアミノ酸配列を解析したところ、8 クローン中 5 クローンが TCR V β 6 family を使用し、残りの 3 クローンは V β 12.2 であった。また、V β 6 を有するクローンの α 鎖の抗原特異性を決定すると考えられている complementarity determining region 3 にはアルギニンを中心とした motif が認

められた。このことより、これらのクローンは、同一あるいは極めて類似のエピトープを認識していることが推測された。

これらのクローンの認識する抗原の同定のために、RA 滑膜細胞を高張 KCl-phosphate buffer にて処理し、可溶化抗原を得た。健康人由来末梢血 APC の存在下で、これらの T 細胞クローンは、可溶化抗原に対し HLA-DR 拘束性に反応した。可溶化抗原のみ、あるいは可溶化抗原で先に刺激した末梢血 APC の培養上清のみでは T 細胞クローンの増殖は認められなかった。またパラホルムアルデヒドで前処理した末梢血 APC の存在下では、T 細胞クローンは可溶化抗原に反応しなかったが、可溶化抗原で一定時間処理したのち培養液中の抗原を除いた末梢血 APC には反応した。従って、可溶化した抗原は通常の抗原プロセッシングを受けて HLA-DR 上に提示されることが明らかとなった。この反応性は、複数の RA 滑膜細胞株より抽出した可溶化抗原で確認された。

さらに、non-RA（外傷あるいは変型性関節症）由来滑膜細胞より同一の条件下で可溶化抗原を抽出したが、自己反応性 T 細胞クローンは HLA-DR-matched の健康人末梢血 APC の存在下で、これらの可溶化抗原に対しては反応しなかった。HPLC により分画した RA 滑膜細胞由来可溶化抗原に対しての自己反応性 T 細胞クローンの反応性を検討したところ、8 クローンすべてが同一の分画に反応性を示し、その予想される分子量は 50kDa および 25kDa であった。

【考 察】

RA 患者罹患関節より得た自己反応性 T 細胞クローンは、HLA-DR 拘束性に非自己 RA 滑膜細胞にも反応性を示した。このことは RA 患者間において共通の抗原が発現されていることを示すものであった。また、T 細胞の抗原特異性を決定する TCR レパトアが限定されていることから、同一あるいは極めて類似したエピトープを認識する T 細胞が RA 患者間で共通に存在する可能性も示した。さらにこの抗原は、RA 患者の末梢血 APC や non-RA 滑膜細胞には存在せず、RA 滑膜細胞に特異的に発現している可能性が高く、RA 特異抗原の存在を強く示唆するものであった。

審 査 結 果 の 要 旨

慢性関節リウマチ（RA）は原因抗原が不明の自己免疫疾患と考えられている。罹患滑膜には CD4+CD45RO+ の T 細胞の集簇がみられ、自己抗原特異的 T 細胞の存在が推測されていた。RA 特異抗原の探索を目的とした従来の報告では、II 型コラーゲン、熱ショック蛋白等が候補として挙げられているが、これらを認識する T 細胞は、あらかじめ抗原で刺激し樹立されており、厳密に疾患特異性を検討するのは困難であった。

本申請者は、上記の問題点を解決し RA 特異的抗原の存在を検討するため、RA 患者の罹患関節より特定の抗原で刺激することなく T 細胞クローンを樹立した。複数の RA 患者由来のこれらの CD4+T 細胞クローンは、自己および非自己 RA 滑膜細胞に対する HLA-DR 拘束性（HLA-DR4 あるいは DR9）の増殖活性を指標に選択された。T 細胞クローンの反応性は抗 HLA-DR あるいは抗 TCR $\alpha\beta$ 抗体により完全に阻害された。これらのクローンは、DR4 ないし DR9 を発現させたマウス線維芽細胞には反応せず、さらに、自己末梢血抗原提示細胞（APC）および DR-matched 健常人 APC にも増殖活性を示さなかったことから、滑膜細胞に特異的に発現する抗原を HLA-DR を介して認識することが強く示唆された。また、これらクローンの T 細胞レセプター（TCR）を解析したところ、複数の患者由来であるにも関わらず、すべてが TCR V β 6 あるいは TCR V β 12 を使用していた。クローンの TCR V α には偏りが認められなかったものの、TCR V β 6+クローンの TCR α 鎖において、CDR3 領域にアルギニンを中心としたモチーフが認められた。TCR の共通性から、クローンは極めて類似したエピトープを認識している可能性が推測された。さらにクローンの認識する抗原の同定のため、RA 滑膜細胞を高張 KCl 溶液で処理し、可溶化抗原を得たところ、DR-matched 健常人 APC の存在下で、T 細胞クローンはこの抗原に対し DR 拘束性かつ用量依存性に増殖活性を示した。しかし、変形性関節症由来滑膜細胞、滑膜細胞以外の間葉系細胞等の可溶化蛋白には増殖活性を示さず、T 細胞クローンの認識する抗原は RA 滑膜細胞特異的であることが示唆された。RA 可溶化抗原の HPLC 分画に対する反応性を解析したところ、すべてのクローンが予想される分子量 50/25kDa の蛋白を認識することが確認された。

本研究により、いままで不明であった RA 特異的抗原の存在を強く示唆する所見が初めて得られた。また、本抗原が疾患特異的かつ組織特異的であることも従来の研究からは得られなかった重要な所見であり、これらは今後の RA 病態の解明の進展に大きく寄与すると考えられる。申請者の研究遂行能力の高さ、所見の正確明解さ、結論・考察の適切さ、すべてにおいて学位授与に値すると判定する。